

⑫ 公開特許公報(A) 平1-101882

⑬ Int. Cl.

C 12 N 5/00  
5/02

識別記号

庁内整理番号

E-8515-4B  
8515-4B

⑭ 公開 平成1年(1989)4月19日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 動物細胞の培養方法

⑯ 特 願 昭62-258252

⑰ 出 願 昭62(1987)10月15日

⑱ 発 明 者 渡 嘉 敷 通 之 東京都日野市旭が丘4丁目3番1号 帝人株式会社生物工  
学研究所内

⑲ 発 明 者 新 井 貴 巳 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社生物工  
学研究所内

⑳ 出 願 人 帝 人 株 式 会 社 大阪府大阪市東区南本町1丁目11番地

㉑ 代 理 人 弁 理 士 前 田 純 博

明 細 書

1. 発明の名称

動物細胞の培養方法

2. 特許請求の範囲

動物細胞を生細胞密度  $3 \times 10^5$  cells / ml 以上で渾液培養するにあたり、培養系におけるグルコース濃度を  $0.01 \text{ mmol/l}$  以上  $3 \text{ mmol/l}$  以下に維持して培養することを特徴とする培養方法。

3. 発明の詳細な説明

(a) 産業上の利用分野

本発明は動物細胞の培養方法に関するものである。更に詳しくは、有用物質を産生する動物細胞を、高密度で培養する方法に関するものである。

(b) 従来技術

大規模による細胞大量培養は、例えばウイルス、ワクチン、インターフェロンなどの抗ウイルス剤、あるいはホルモンなどの生物製品の製造に必須である。殊に近年特定タンパク質などを標的とするモノクローナル抗体の生産は、抗体産生細胞とミ

エローマによるハイブリドーマ大量培養によるものであり、その技術の解決は工業的に重要なテーマである。

(c) 発明の目的

そこで本発明者らは、動物細胞の高密度培養方法において更に効率良く培養を行う方法について鋭意研究を行った結果、本発明に到達した。

(d) 発明の構成

すなわち、本発明は動物細胞を生細胞密度  $3 \times 10^5$  cells / ml 以上で渾液培養するにあたり、培養系におけるグルコース濃度を  $0.01 \text{ mmol/l}$  以上  $3 \text{ mmol/l}$  以下に維持して培養することを特徴とする培養方法である。

以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明の培養方法において、培養する動物細胞としては、特に制限はなく、天然の動物細胞のみならず人為的或いは遺伝子操作により変性された細胞例えばハイブリドーマであってもよい。

また細胞として1-2-の如きリンホカインを産生するリンパ球由来の細胞であってもよく、

インターフェロン（IFN）のとき有用な生理活性物質を産生する2倍体細胞であってもよい。さらに種々のモノクローナル抗体を産生する細胞であってもよく、本発明はかかるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの培養に対してモノクローナル抗体を高い濃度で 目的のために特に適している。

細胞の形態としては、特に制限はなく、浮遊細胞でも培養細胞でもよいが、本発明方法では浮遊細胞であることが好ましい。

本発明における細胞培養は浮遊培養でも付着培養でもよい。

本発明における細胞培養は灌流培養で行われる。ここで、灌流培養とは、一般に新しい培養液を培養槽中へ供給しつつ、生育阻害物質を含んだ古い培養液を培養槽外へ排出しながら培養を行う培養方式である。

この方法を用いて培養するに当って重要なことの1つは、培養液中の生細胞と貧乏古い培養液とを効率よく分離し、古い培養液を培養槽外へ取り

出し、培養槽内の細胞の生育環境を最適条件下に維持することである。

本発明における培養方法としては、タンク培養、細胞を担体に付着させたものを充填剤として用いる培養およびフローファイバー培養等がある。ここでタンク培養には、浮過法、重力沈降法、遠心沈降法等があり、それぞれマイクロキャリアを用いてもよい。また、細胞を担体に付着させたものを充填剤として培養を行う場合、該担体としてはマイクロカプセル、セラミックス担体およびゲル等が用いられる。

本発明方法においては、タンク培養による灌流培養が好ましい。

本発明方法の培養に用いられる培養液は実質的に水よりなる水性媒体である。該水性媒体は、動物細胞の培養に通常使用される各種添加物例えば種々の無機塩、ビタミン類、補酵素、ブドウ糖、アミノ酸、抗生物質、生長促進因子などを含有している。一般に培養液中に含まれる糖成分としてはグルコースが用いられ、該グルコース濃度は20

mmol/l である。しかしながら本発明方法によれば動物細胞を生細胞密度  $3 \times 10^4$  cells/ml 以上、好ましくは  $5 \times 10^4$  cells/ml 以上で灌流培養するにあたり培養系におけるグルコース濃度は0.01 mmol/l 以上、3 mmol/l 以下、好ましくは0.2 mmol/l 以上、2 mmol/l 以下でよい。グルコースの濃度が3 mmol/l を超えると動物細胞が必要以上のグルコースを消費し、ラクテートの生産量が増大し、得られる目的物質の精製が困難となる。またグルコースの濃度が0.01 mmol/l より少ないと動物細胞の増殖がおさえられる。また動物細胞の生細胞密度が、 $3 \times 10^4$  cells/ml に達しない時点でグルコース濃度を、0.01 mmol/l 以上3 mmol/l 以下とすると、動物細胞の増殖はおさえられ、死滅していく。

更に、培養液には血清を加えることもできるが、血清を用いない所謂無血清培地を培養液として使用することもできる。無血清培地を使用するのが経済的に有利であり、望ましい。

以下、実施例を掲げて本発明を詳述する。

#### 実施例1

##### (1) 培養装置

添付図1に示す構造を有する内容積約200 ml、有効培養容積（細胞が存在する部分の容積）120 mlの重力沈降型灌流培養槽（特開昭62-265号公報参照）を用いた。

##### (2) 細胞

マウスミエローマP3/×63-Ag8-U1株とヒトBセルを融合して得られたマウス・ヒトハイブリドーマC23株を用いた。この株は、ヒト型抗サイトメガロウイルス1 g G1産生する。

##### (3) 培地及びグルコース溶液

無血清培地TES+eRDFからグルコースを除去したものを浮過滅菌して用いた。インシュリン、ヒトトランスフェリン、エタノールアミン、および亜セレン酸ナトリウムの添加量はそれぞれ9 mg/l、10 mg/l、0.62 mg/l、 $0.43 \times 10^{-3}$  mg/l である。培地には5 mM HEPES、1 g/l 水酸化ナトリウム、 $10^{-5}$  I

U / I ペニシリン 0.1 g / l ストプトマイシンを添加した。

グルコース溶液としては、eRDF 培地に 10 % のグルコースを溶解したものを透過滅菌して用いた。

#### (4) 培養方法及び結果

37℃ の恒温水槽中に設置された培養槽に透過滅菌した培地 150 ml およびグルコース溶液 5 ml を入れ C 23 株を  $5 \times 10^5$  個接種した。培養槽においては、炭酸ガス 5 % 含有空気が空間部に、純酸素ガスが培養液中に流入しうようになり、溶存酸素量が 3 ~ 4 ppm の範囲で一定になるように制御された。攪拌速度は 20 r.p.m. であった。

培養開始 2 日目よりノズル 3 から培地を 240 ml / day で送し循環を開始した。グルコース溶液は 2 日目から 4 日目まではノズル 4 から 8.6 ml / day 送し、5 日目以降は 8 時間に 1 回 図 1 のノズル 10 よりサンプリングを行ってグルコースの濃度を測定しその濃度が 2 ~ 3

mmol / l となるようにポンプの流量を調節して培養を継続した。かくして 18 日間培養を行った結果は表 1 の通りであった。

表 1

培養日数	細胞密度 [cells / ml]	培 養 液 中 グルコース濃度 [mmol / l]	グルコース消費速度 [mmol / cell · day]	培養液中 乳酸濃度 [mmol / l]	乳酸生成速度 [mmol / cell · day]	乳酸生成 グルコース消費	Ig G 濃度 [μg / ml]
0	$5 \times 10^5$	20	—	—	—	—	—
2	$1 \times 10^6$	—	—	—	—	—	—
4	$2.7 \times 10^6$	—	—	—	—	—	—
7	$8.0 \times 10^6$	2.7	4.3	16	4.0	0.92	28
9	$1.2 \times 10^7$	2.4	2.9	9.7	1.6	0.55	31
11	$1.5 \times 10^7$	1.7	2.4	13	1.7	0.72	37
13	$1.3 \times 10^7$	2.6	2.7	16	2.5	0.9	39
15	$1.5 \times 10^7$	1.8	2.4	15	2.0	0.8	32
18	$1.3 \times 10^7$	2.9	2.6	14	2.2	0.84	39

## 実施例 2

## (1) 培養装置

添付図2に示す培養システムを用いた。培養槽(A P-1)は実施例1と同じである。図2のA P-2はプレートアンドフレーム型限外濾過装置である。限外濾過膜はシリポア社製ペリコンラボカセット用限外濾過膜を使用した。膜の分画分子量は10,000である。

## (2) 細胞：実施例1と同じものを用いた。

## (3) 培地及びグルコース溶液

培地はインシュリン、トランスフェリンの添加量はそれぞれ  $1.8 \text{ ng/l}$ 、 $2 \text{ ng/l}$  としそれ以外の組成は実施例1と同じものを用いた。グルコース溶液は実施例1と同じものを用いた。

## (4) 培養方法および結果

あらかじめオートクレーブ滅菌した前記培養槽に正味培養容積が約200 mlになるように培養液を送入して、グルコース溶液6.7 mlををさらに追加して細胞を播種した。培養槽の温度、溶存酸素コントロール、攪拌速度は実施例1に同

じである。

播種後2日間は回分培養を行った。3日目から灌流を開始し表2に示すように培養開始後4日目に細胞密度は $1.1 \times 10^6$  個/mlに達し、培地とグルコース溶液の送込比は24:1とした。灌流の尺度として正味培養容積の1日当り置換率として表わし実験結果を併記する。すなわちポンプP-I、P-II、P-IIIを駆動しバルブXを開、バルブYを閉として、培養槽内で細胞と分離された培養液をラインDから抜きとり、その量と同じ量の新培地をラインAから連続的に送込した。限外濾過装置A P-2には分子量分画10,000の限外濾過膜がセットされており、ラインFからは膜を通過した液を、またラインEからは膜を通過しなかった液を系外に取り出した。時間の経過とともに細胞密度が上昇し、7日には $2.9 \times 10^6$  個/mlに達した。この時点で図2においてバルブXを閉じバルブYを開き限外濾過膜を通過しなかった液はラインGを通して培養槽に循環した。またこの時点から8時間

に1回培養槽からサンプリングを行ってグルコース濃度を測定し、その濃度が $1.5 \text{ mmol/l}$ 以下になることを目標に送込量を調節して培養を継続した。

かくして40日間培養を行った結果は表2の通りであった。

表 2

培養 日数	培養液 粘着の 有 無	培 養 液 置 換 率 [day <sup>-1</sup> ]	細胞 密 度 [cells/cm <sup>2</sup> ]	培養液中グル コース濃度 [mmol/l]	グルコース 消費速度 [mmol/cell · day]	培養液中 乳酸濃度 [mmol/l]	乳酸生成速度 [mmol/cell · day]	乳酸生成 グルコース消費 [-]	培養液中 lg G濃度 [μg/ml]
0	無	0	3 × 10 <sup>6</sup>	20	—	—	—	—	—
4	有	0.6	1.1 × 10 <sup>6</sup>	12	4.4	—	—	—	—
7	"	1.3	2.9 × 10 <sup>6</sup>	8.6	5.1	20.8	9.3	1.8	—
9	"	"	6.0 × 10 <sup>6</sup>	—	—	—	—	—	19
12	"	"	1.5 × 10 <sup>7</sup>	2.4	1.5	16	1.4	0.92	30
16	"	"	1.8 × 10 <sup>7</sup>	0.72	1.4	17	1.2	0.87	360
20	"	"	1.4 × 10 <sup>7</sup>	1.1	1.8	11	1.0	0.93	540
24	"	"	2.5 × 10 <sup>7</sup>	0.2	1.0	21	1.0	1.0	780
35	"	"	2.4 × 10 <sup>7</sup>	0.44	1.0	14	0.76	0.76	1,100
40	"	"	3.0 × 10 <sup>7</sup>	0.67	0.8	17	0.74	0.93	1,200

比較例 1

培養開始 5 日目以降の培養系中グルコース濃度  
が 10～15mmol/l となるようにする以外は実施例  
1 と同様にして培養を行った結果を表 3 に示す。

表 3

培養日数	細胞密度 [cells / ml]	培養液中 グルコース濃度 [mmol/l]	グルコース消費速度 [mmol/cell · day]	培養液中 乳酸濃度 [mmol/l]	乳酸生成速度 [mmol/cell · day]	乳酸生成 グルコース消費	Ig G濃度 [μg/ml]
0	$5 \times 10^5$	—	—	—	—	—	—
2	$9 \times 10^5$	—	—	—	—	—	—
4	$2.4 \times 10^6$	—	—	—	—	—	—
7	$6 \times 10^5$	12	9.4	48	16	1.7	24
9	$7 \times 10^5$	11	8.2	48	14	1.7	31
11	$6.0 \times 10^5$	11	7.9	36	12	1.6	21
13	$5.5 \times 10^5$	13	9.1	41	15	1.7	23
15	$7.1 \times 10^5$	12	7.6	44	13	1.7	32
17	$6.1 \times 10^5$	10	9.7	50	17	1.8	28
19	$5.5 \times 10^5$	14	9.1	43	16	1.8	30

## 比較例 2

増殖した細胞数を  $1 \times 10^6$  個とし培養開始時より培養液中グルコース濃度を  $1 \sim 3 \text{ mmol/l}$  とし、培養開始直後から培地送入速度  $240 \text{ ml/day}$  で濃流する以外は、実施例 1 と同様にして培養した結果を表 4 に示す。

実施する工程の該略図を示したものである。

特許出願人 帝人株式会社  
代理人 弁理士 青田純博



表 4

培養日数	0	1	2	3	4
生細胞密度 (cells / ml)	$1 \times 10^6$	$0.9 \times 10^6$	$5.1 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^4$
培養液中グルコース 濃度 (mmol/l)	2.1	0.9	0.8	1.2	1.2

## (c) 発明の効果

従って、本発明方法によれば動物細胞の高密度培養方法において培地コストの低減が可能となり、得られた目的物質の分離、精製が行いやすくなり、より効率的に培養を行うことが可能となる。

## 4. 図面の簡単な説明

図 1 および図 2 はそれぞれ本発明の培養方法を

図 1

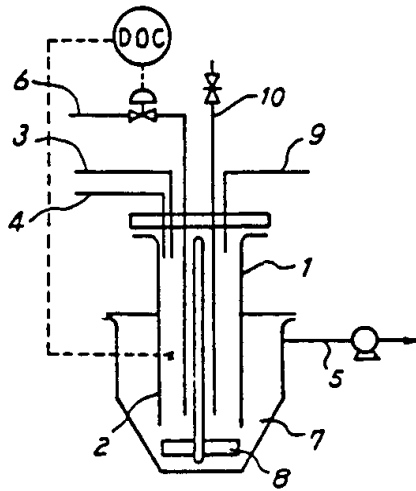
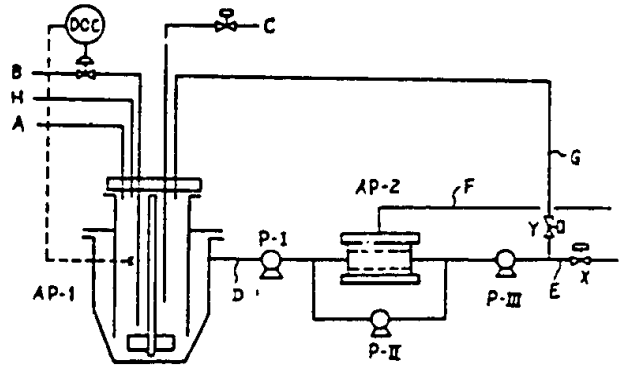


図 2



Code: 1180-27682

## JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT JOURNAL

KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 1[1989]-101882

Int. Cl. <sup>4</sup> :	C 12 N	5/00 5/02
Sequence Nos. for Office Use:	E-8515-4B 8515-4B	
Application No.:	Sho 62[1987]-258252	
Application Date:	October 15, 1987	
Publication Date:	April 19, 1989	
No. of Inventions:	1 (Total of 7 pages)	
Examination Request:	Not Requested	

## CULTURE METHOD FOR ANIMAL CELLS

Inventors:	Michiyuki Watagashiki Teijin Ltd., Bioengineering Research Lab. 4-3-1 Asahigaoka Hino-shi, Tokyo-to
	Yoshimi Arai Teijin Ltd., Bioengineering Research Lab. 4-3-2 Asahigaoka Hino-shi, Tokyo-to



Applicant: Teijin Ltd.  
1-11 Minami-hon-machi  
Higashi-ku, Osaka-shi,  
Osaka-fu

Agent: Yoshihiro Maeda,  
patent attorney

[There are no amendments to this patent.]

### Claims

A culture method characterized in that animal cells are cultured by perfusion culture at viable cell densities of over  $3 \times 10^6$  cells/mL, while maintaining the glucose concentration in the culture system above 0.01 mmol/L and less than 3 mmol/L.

### Detailed explanation of the invention

#### Industrial use of the invention

This invention concerns a method for culturing animal cells. More specifically, it concerns a method for high density culture of animal cells which produce useful substances.

#### Prior art

Mass cell cultivation on a large scale is essential for producing viruses, vaccines, antiviral agents such as interferon, or biological drugs such as hormones. In particular, the recent production of monoclonal antibodies with specific protein targets

depends on mass cultivation of hybridomas from antibody-producing cells and myelomas. Solving of this technology is an important industrial topic.

#### Purpose of the invention

Therefore, upon conducting diligent research on culture methods with good efficiency in high density cultivation methods for animal cells, the inventors arrived at this invention.

#### Organization of the invention

That is, this invention is a culture method characterized in that animal cells are cultured by perfusion culture at viable cell densities of greater than  $3 \times 10^6$  cells/mL, while maintaining the glucose concentration in the culture system above 0.01 mmol/L and less than 3 mmol/L.

This invention is explained in further detail below.

In the culture method of this invention, there are no particular limitations on the animals cells to be cultured. They can be not only natural animal cells but also cells modified by artificial or genetic manipulations such as hybridomas.

And, cells can be cells derived from lymphocytes which produce lymphokines like IL-2 or diploid cells which produce useful physiologically active substances like interferon (IFN). Furthermore, they can be cells which produce various monoclonal antibodies. This invention is particularly suited for cultivation of hybridomas for producing said monoclonal antibodies and obtaining monoclonal antibodies in high concentrations.

There are no particular restrictions on the form of the cells. [They] can be either suspended cells or cultivated cells but in the method of this invention, suspended cells are preferable.

The cell cultures in this invention can be suspension or monolayer cultures.

Cells are cultured in this invention by perfusion culture. Here, perfusion culture is generally a cultivation mode in which cultivation is conducted while supplying new cultivation solution to the culture tank and discharging old cultivation solution containing growth-inhibiting substances from the culture tank.

When using this cultivation method, one of the important points is to separate the viable cells in the cultivation solution from the above old cultivation solution efficiently, removing the old cultivation solution from the culture tank and maintaining the optimal growth environment for the cells in the culture tank.

For the culture method of this invention, there is tank cultivation, cultivation in which cells are used as packed cells attached to carriers and follow [sic; hollow] fiber cultivation. For tank cultivation, there are filtering methods, gravity sedimentation methods, centrifugation sedimentation methods. Each can use microcarriers. And, in the case of cultivation with cells used as packed cells attached to carriers, microcapsules, ceramic carriers and gels are substances used for said carriers.

In the method of this invention, perfusion culture by tank cultivation is preferable.

The cultivation solution used in the culture method of this invention is an aqueous medium consisting essentially of water.

Said aqueous medium contains various additives that are normally used in cultivating animal cells, for example, various inorganic salts, vitamins, coenzymes, glucose, amino acids, antibiotics, growth promoting factors, etc. Generally glucose is used as the sugar component contained in the cultivation solution and said glucose concentration is 20 mmol/L. However, with the method of this invention, when perfusion culturing animal cells at viable cell densities of over  $3 \times 10^6$  cell/mL, preferably over  $5 \times 10^6$  cells/mL, the glucose concentration can be greater than 0.01 mmol/L and less than 3 mmol/L, preferably, greater than 0.2 mmol/L and less than 2 mmol/L. If the glucose concentration exceeds 3 mmol/L, the animal cells consume more glucose than necessary, the amount of lactate produced increases and purification of the desired substance obtained becomes difficult. Also, if the glucose concentration is less than 0.01 mmol/L, the proliferation of the animal cells is suppressed. If the glucose concentration is greater than 0.01 mmol/L and less than 3 mmol/L before the viable cell density of the animal cells has reached  $3 \times 10^6$  cells/mL, animal cell proliferation is suppressed and they start to die.

It is also possible to add serum to the cultivation solution. But so-called serum-free media which do not use serum can also be used for cultivation solutions. Using serum-free media is economically advantageous and desirable.

This invention is described in detail below citing application examples.

### Application Example 1

#### 1. Culture device

The gravity sedimentation perfusion culture tank (see the Official Gazette for Japanese Kokai Patent Application No. Sho 62[1987]-265) having the configuration shown in appended Figure 1 with an internal volume of about 200 mL and an effective cultivation volume (the portion of the volume in which the cells exist) of 120 mL was used.

#### 2. Cells

Mouse-human hybridoma C23 colonies obtained by fusing mouse myeloma P3/X63-Ag8-U1 colonies with human B cells were used. These colonies produce human anticytomegalovirus IgG1.

#### 3. Cultivation and glucose solutions

One in which glucose was removed from serum-free medium ITES+eRDF, which was filtered, sterilized and used. The respective amounts of insulin, human transferrin, ethanolamine, and sodium selenite were 9 mg/L, 10 mg/L, 0.62 mg/L and  $0.43 \times 10^{-3}$  mg/L. In the medium, 5 mM HEPES, 1 g/L sodium hydroxide,  $10^5$  IU/L penicillin and 0.1 g/L streptomycin were added.

For the glucose solution, one in which 10% glucose was dissolved in eRDF medium, which was filtered, sterilized and used.

#### 4. Culture method and results

150 mL of the filtered, sterilized medium and 5 mL of the glucose solution were placed in the culture tank placed in a

constant temperature water tank at 37°C and C23 strains were inoculated with  $5 \times 10^5$  colonies. The culture tank was made so that air containing 5% carbon dioxide could be introduced into the air space and, vice versa, pure oxygen gas could be introduced into the cultivation solution. The flow was regulated so that the amount of dissolved oxygen would be constant in the range of 3-4 ppm. The stirring rate was 20 rpm.

From the 2nd day after starting cultivation, medium was introduced at 240 mL/day from nozzle (3) and perfusion culture was started. 8.6 mL/day of the glucose solution were introduced from nozzle (4) from the 2nd to the 4th days. From the 5th day, once every 8 h, sampling was performed from nozzle (10) of Figure 1 to measure the glucose concentration. The pump flow was adjusted so that this concentration would be 2-3 mmol/L and cultivation was continued. The results of cultivation for 18 days in this manner were as in Table I.

Table I

① 培養日数	② 細胞密度 [cells / ml]	③ 培養液中 グルコース濃度 [mmol / l]	④ グルコース消費速度 [mmol / cell · day]	⑤ 培養液中 乳酸濃度 [mmol / l]	⑥ 乳酸生成速度 [mmol / cell · day]	⑦ 乳酸生成 グルコース消費	⑧ lg C濃度 [μg / ml]
0	$5 \times 10^5$	20	—	—	—	—	—
2	$1 \times 10^6$	—	—	—	—	—	—
4	$2.7 \times 10^6$	—	—	—	—	—	—
7	$8.0 \times 10^6$	2.7	4.3	16	4.0	0.92	28
9	$1.2 \times 10^7$	2.4	2.9	9.7	1.6	0.55	31
11	$1.5 \times 10^7$	1.7	2.4	13	1.7	0.72	37
13	$1.3 \times 10^7$	2.6	2.7	16	2.5	0.9	39
15	$1.5 \times 10^7$	1.8	2.4	15	2.0	0.8	32
18	$1.3 \times 10^7$	2.9	2.6	14	2.2	0.84	39

cell  
density      glucose

Key: 1      Number of days cultured  
      2      Cell density  
      3      Glucose concentration in cultivation solution  
      4      Glucose consumption rate  
      5      Lactic acid concentration in cultivation solution  
      6      Lactic acid production rate  
      7      Lactic acid production/glucose consumption  
      8      IgG concentration

### Application Example 2

#### 1.    Culture device

The cultivation system shown in appended Figure 2 was used. The culture tank (AP-1) was the same as Application Example 1. AP-2 of Figure 2 is a plate and frame ultrafiltration device. For the ultrafiltration membranes, ultrafiltration membranes made by Sillipore [sic; Millipore] for Pericon [transliteration] Lab Cassettes were used. The fractionation molecular weight of the membrane was 10,000.

2.    Cells:    The same ones as in Application Example 1 were used.

#### 3.    Cultivation and glucose solutions

For the medium, the amounts of insulin and transferrin added were 1.8 mg/L and 2 mg/L, respectively. As for the composition aside from this, the same one as in Application Example 1 was used. For the glucose solution, the same one as in Application Example 1 was used.

#### 4. Cultivation method and results

In the above culture tank, sterilized beforehand in an autoclave, cultivation solution was poured in so that the net culture volume would be about 200 mL. 6.7 mL of glucose solution were also added and cells were inoculated. Cultivation tank temperature, dissolved oxygen control and stirring rate were the same as Application Example 1.

For 2 days after inoculation, batch-cultivation was performed. From the 3rd day, perfusion culture was started. As shown in Table 2, from the 4th day after starting the culture, cell densities reached  $1.1 \times 10$  [illegible] cells/mL. The ratio of medium and glucose solutions introduced was 24:1. The measure for perfusion was expressed as the exchange rate/day of the net cultivation volume and the experimental results are recorded together. That is, pumps P-I, P-II and P-III ran, valve X opened, valve Y closed, cultivation solution separated from the cells in the culture tank was withdrawn from line D and the same amount of new medium was introduced continuously through line A. An ultrafiltration membrane which passes the fraction with MW  $\leq$  10,000 was placed in ultrafiltration device AP-2. From line F, fluid that had passed through the membrane and from Line E, fluid that had not passed through the membrane were removed from the system. With the passing of time, the cell density increased and on day 7, reached  $2.9 \times 10$  [illegible] cells/mL. At this time, valve X in Figure 2 was closed and valve Y was opened and the fluid that did not pass through the ultrafiltration membrane was [re]circulated to the culture tank through line G. Also, from this time, once every 8 h, sampling of the culture tank was performed to measure the glucose concentration. The amount



introduced was adjusted with the goal of making its concentration less than 1.5 mmol/L and cultivation was continued.

The results of cultivation in this manner for 40 days were as in Table II.

Table II

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
培養 日数	培養液 循環の 有 無	培 養 液 置 換 率 [day <sup>-1</sup> ]	細 胞 密 度 [cells/ml]	培養液中グル コース濃度 [mmol/l]	グルコース 消費速度 [mmol/cell · day]	培養液中 乳酸濃度 [mmol/l]	乳酸生成速度 [mmol/cell · day]	乳酸生成 グルコース消費 [-]	培養液中 10 G濃度 [μg/ml]
0	無	0	$3 \times 10^6$	20	—	—	—	—	—
4	有	0.6	$1.1 \times 10^6$	12	4.4	—	—	—	—
7	"	1.3	$2.9 \times 10^6$	8.6	5.1	20.8	9.3	1.8	—
9	"	"	$6.0 \times 10^6$	—	—	—	—	—	19
12	"	"	$1.5 \times 10^7$	2.4	1.5	16	1.4	0.92	30
16	"	"	$1.8 \times 10^7$	0.72	1.4	17	1.2	0.87	360
20	"	"	$1.4 \times 10^7$	1.1	1.8	11	1.0	0.93	540
24	"	"	$2.5 \times 10^7$	0.2	1.0	21	1.0	1.0	780
35	"	"	$2.4 \times 10^7$	0.44	1.0	14	0.76	0.76	1,100
40	"	"	$3.0 \times 10^7$	0.67	0.8	17	0.74	0.93	1,200

Key: 1 Number of days cultured  
 2 Presence or absence of [re]circulation of cultivation solution  
 3 Cultivation solution exchange rate  
 4 Cell density  
 5 Glucose concentration in cultivation solution  
 6 Glucose consumption rate  
 7 Lactic acid concentration in cultivation solution

- 8 Lactic acid production rate
- 9 Lactic acid production/glucose consumption
- 10 IgG concentration
- 11 None
- 12 Present

### Comparative Example 1

The results of cultivation in the same manner as in Application Example 1 aside from making the glucose concentration in the culture system 10-15 mmol/L from the 5th day after starting cultivation are shown in Table III.

Table III

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
培養日数	細胞密度 [cells / ml]	培養液中 グルコース濃度 [mmol/l]	グルコース消費速度 [mmol/cell · day]	培養液中 乳酸濃度 [mmol/l]	乳酸生成速度 [mmol/cell · day]	乳酸生成 グルコース消費	Ig G濃度 [μg/ml]
0	$5 \times 10^4$	—	—	—	—	—	—
2	$9 \times 10^4$	—	—	—	—	—	—
4	$2.4 \times 10^5$	—	—	—	—	—	—
7	$6 \times 10^4$	12	9.4	46	16	1.7	24
9	$7 \times 10^4$	11	8.2	46	14	1.7	31
11	$6.0 \times 10^4$	11	7.9	36	12	1.6	21
13	$5.5 \times 10^4$	13	9.1	41	15	1.7	23
15	$7.1 \times 10^4$	12	7.6	44	13	1.7	32
17	$6.1 \times 10^4$	10	9.7	50	17	1.8	28
19	$5.5 \times 10^4$	14	9.1	43	16	1.8	30

- Key: 1 Number of days cultured  
 2 Cell density  
 3 Glucose concentration in cultivation solution  
 4 Glucose consumption rate  
 5 Lactic acid concentration in cultivation solution  
 6 Lactic acid production rate  
 7 Lactic acid production/glucose consumption  
 8 IgG concentration

### Comparative Example 2

The results of culturing in the same manner as in Application Example 1 aside from making the number of cells inoculated  $1 \times 10^6$  [illegible], making the glucose concentration in the culture system 1-3 mmol/L from the beginning of culturing and perfusion at a medium introduction rate of 240 mL/day from immediately after starting culturing are shown in Table IV.

Table IV

① 培養日数	0	1	2	3	4
② 生細胞密度 (cells / ml)	$1 \times 10^6$	$0.9 \times 10^6$	$5.1 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^4$
③ 培養液中グルコース 濃度 (mmol/l)	2.1	0.9	0.8	1.2	1.2

- Key: 1 Number of days cultured  
 2 Viable cell density  
 3 Glucose concentration in the cultivation solution

## Effects of the invention

Consequently, with the method of this invention, reduction of the cost of medium for high density cultivation of animal cells becomes possible, separation and purification of the target substance obtained becomes easier, and conducting cultivation more efficiently becomes possible.

## Brief explanation of the figures

Figures 1 and 2 are each rough sketches showing the processes which apply in the cultivation method of this invention.

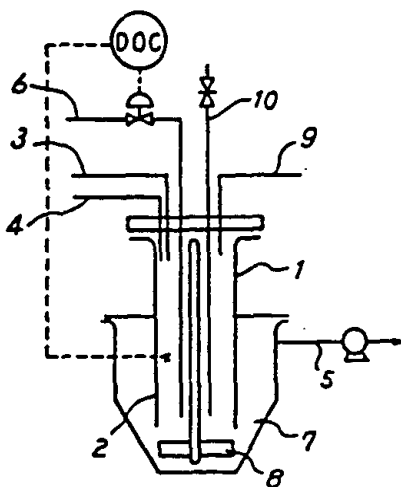


Figure 1

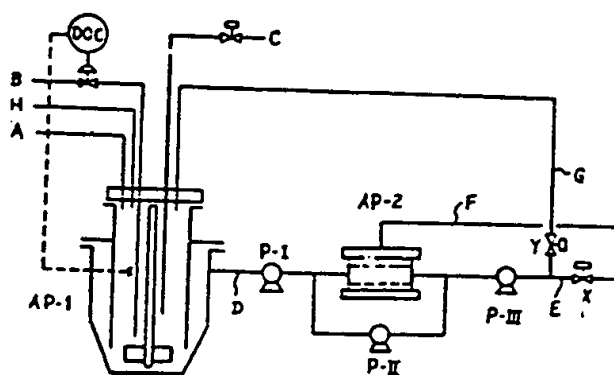


Figure 2

15.  
Japanese Kokai Patent Application No. Hei 1[1989]-101882

---

Translated from Japanese by the Ralph McElroy Company, Custom Division  
P.O. Box 4828, Austin, TX 78765 USA